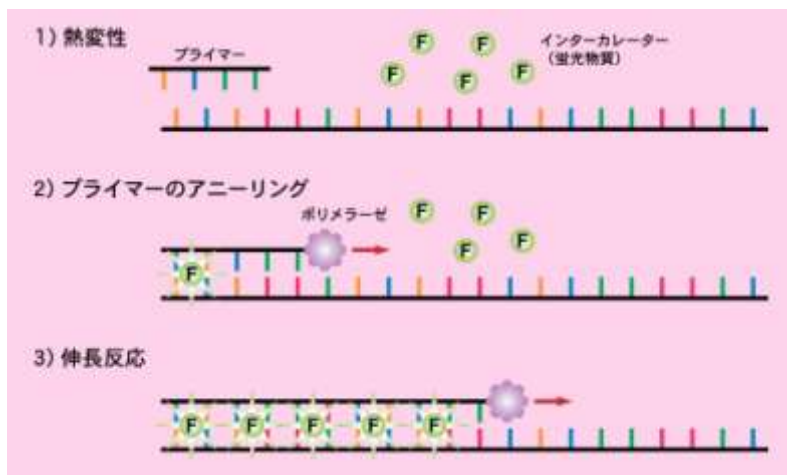
リアルタイムPCR（SYBR® Green I法）実験ガイド

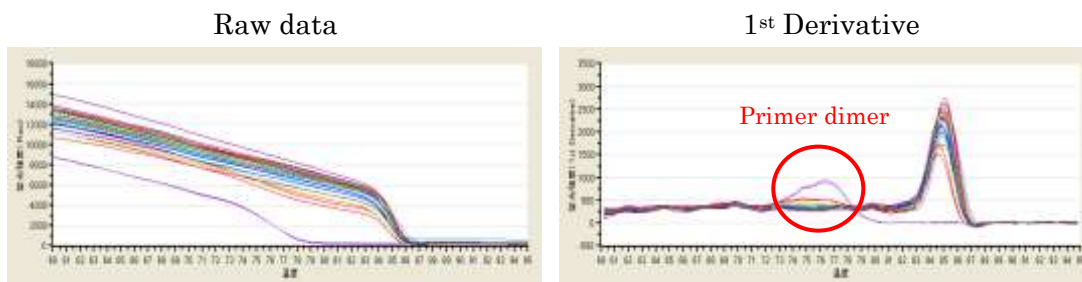
この文書では、SYBR® Green I法によるリアルタイムPCRについて、蛍光検出の原理や実験操作の流れなどを解説します。実際の実験操作の詳細については、各製品の取扱説明書をご参照ください。

－目次－

1　蛍光検出の原理

SYBR® Green I による蛍光検出の原理

SYBR® Green I は、DNA に結合するインターカレーターの一種で、PCR によって合成された二本鎖 DNA に結合し、励起光の照射により蛍光を発します。この蛍光強度を測定することにより、PCR 増幅産物の生成量をモニターできます。さらに後述の融解曲線分析を行うことで適切な増幅産物が得られたかどうかを確認できます。

融解曲線分析による PCR 増幅産物の確認

融解曲線分析では、PCR 反応後、反応液の温度を 60℃から 95℃まで徐々に上昇させ蛍光値をモニタリングします。PCR 産物が二本鎖を形成している状態では強い蛍光が検出されますが、ある一定の温度（Tm 値）に達すると一本鎖に解離し蛍光値が急激に低下します。Tm 値は PCR 産物の長さや GC 含量により異なるので、目的の増幅産物と Primer dimer のような短い増幅産物を区別することができます。

Raw data が蛍光値をモニタリングした元データで、1st Derivative は元データを一次微分してプラスマイナスを反転させたグラフです。このピーク位置を Tm 値として算出します。

2　実験に必要なもの

一般的な実験器具類

マイクロピペット（20, 200, 1000μl）およびチップ（フィルター付き）
1.5 ml チューブおよびチューブラック
攪拌機（Vortex）
小型遠心機（1.5 ml チューブ用、8 連 0.2 ml チューブ用）など
＊詳細は、別冊の「遺伝子検査の準備と注意事項」をご参照ください。

リアルタイム PCR 装置

Thermal Cycler Dice Real Time System シリーズは、日本語仕様の食品環境検査用ソフトウェアを標準搭載しており、遺伝子検査にお勧めの機種です。

器具名称		用途など	
①	Thermal Cycler Dice Real Time System *Lite*（製品コードTP700）	48ウェル対応のコンパクトタイプです。	
②	Thermal Cycler Dice Real Time System *II*（製品コードTP900）	96ウェルタイプのスタンダードタイプです。	

リアルタイム PCR 専用消耗品

Thermal Cycler Dice Real Time System をお使いの場合は、専用の消耗品を使用して下さい。遺伝子検査には、チューブ個別にキャップが付いている 8 連チューブがお勧めですが、反応数が多い場合には、96 ウェルプレート等も使用できます。

器具名称		用途など	
①	0.2 mlチューブ：0.2 ml 8-strip tube, individual Flat Caps（製品コード NJ600）	独立型フラットキャップ付き8連チューブです。ひとつひとつふたの開閉ができ、コンタミネーション回避に役立ちます。切り離せばシングルチューブとしても利用が可能です。	

②	96ウェルプレート： 96well Hi-Plate for Real Time（製品コード NJ400）	反応時には、Sealing Film for Real Time（製品コード NJ500）でシールして使用します。	
③	48ウェルプレート： 48 well snap plate（製品コード NJ700）	24 well×2枚に分割可能な48ウェルプレートです。反応時には、Flat cap for snap plate（製品コード NJ720）でキャップをして使用します。	

リアルタイム PCR 試薬

SYBR Green I 法による微生物遺伝子検査には、QuickPrimer (Real Time)シリーズをお使い頂けます。以下のようにプライマーと試薬を組み合わせて使用します。なお、反応確認用の陽性コントロールも別売りしています。

リアルタイム PCR 用プライマー

・QuickPrimer (Real Time)シリーズ（製品コード MR101 等）

リアルタイム PCR 用試薬

・SYBR *Premix Ex Taq* (Tli RNaseH Plus)（製品コード RR420A/B）

陽性コントロール DNA

・QuickPrimer (Real Time)シリーズ用 Positive Control DNA (製品コード MR401 等)

3　実験操作法

(1) サンプルの調製（エリア 2 で実施）

検体の種類や実験目的に適した方法でサンプルの調製を行います。簡易的な抽出を行う方法としては、熱抽出法やアルカリ熱抽出法があります。高純度な DNA が必要な場合は、DNA 精製キットを使用して調製します。

＊ DNA 調製法に関しては、別冊の「DNA/RNA 調製法 実験ガイド」をご参照ください。

＊ 実験エリアに関しては、別冊の「遺伝子検査の準備と注意事項」をご参照ください。

(2) リアルタイム PCR 用装置のセッティング（エリア 2 で実施）

＊ Thermal Cycler Dice Real Time シリーズを使用する場合は、別冊の「Thermal Cycler Dice Real Time Quick Manual」をご参照ください。

(3) 反応液の調製（エリア 1→3 で実施）

＊ 操作方法の詳細は、各製品の取扱説明書をご参照ください。

① 反応液の調製（エリア 1 で実施）

サンプル以外の試薬のマスターミックスを氷上で調製し、リアルタイム PCR 専用チューブに分注し、キャップを軽く閉めます。

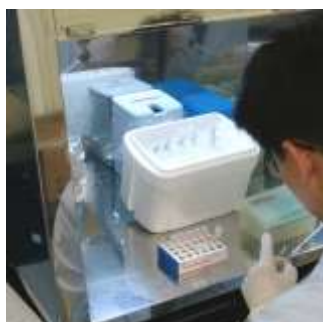
12 反応分のマスターミックス調製例

試薬	1 反応当り	12 反応分
2× SYBR *Premix Ex Taq*	12.5 μl	150 μl
5× Primer mix	5 μl	60 μl
dH_2O	2.5 μl	30 μl

② 陰性コントロールの添加（エリア 1 で実施）

陰性コントロールのチューブに dH_2O を 5 μl 添加し、チューブのキャップをしっかり閉めます。

③ サンプルおよび陽性コントロールの添加（エリア 3 で実施）

エリア 3 に移動し、(1)で調製したサンプルおよび陽性コントロールを各 5 μl 添加し、チューブのキャップをしっかり閉めます。

リアルタイム PCR 反応液は、コンタミネーション防止のため、クリーンベンチ内で調製します。試薬は、酵素の失活を避けるため、アイスボックス内で氷上で取り扱ってください。

(4) リアルタイム PCR の開始（エリア 2 で実施）

リアルタイム PCR 反応液が入ったチューブを軽くスピンダウンし、リアルタイム PCR 装置にセットし、反応を開始します。

4　結果の解析

増幅曲線と Ct 値

PCR 増幅の有無は、増幅曲線で確認します。

コントロール反応の結果が適切であることを確認した上で、測定対象サンプルの増幅の有無を判定します。増幅が認められない場合には、陰性と判定されます。ただし、PCR 阻害物質による偽陰性の可能性がありますので、注意してください。増幅が認められた場合は、次の融解曲線の結果と合わせて判定を行います。

増幅曲線が閾値に達した時のサイクル数を Ct 値と呼び、Ct 値は初期鋳型量の目安となります。Ct 値が小さい場合は鋳型量が多く、Ct 値が大きい場合は鋳型量が少なかったと推測されます。

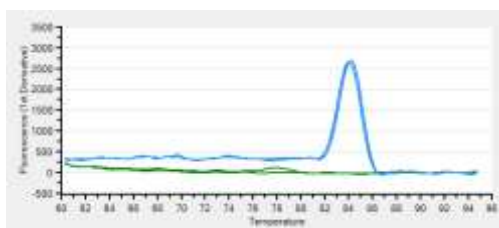
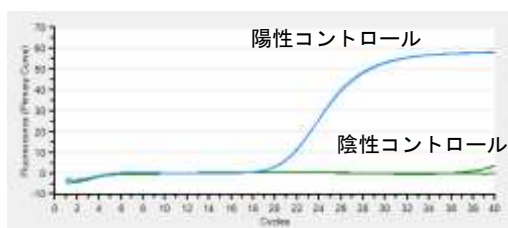
融解曲線と Tm 値

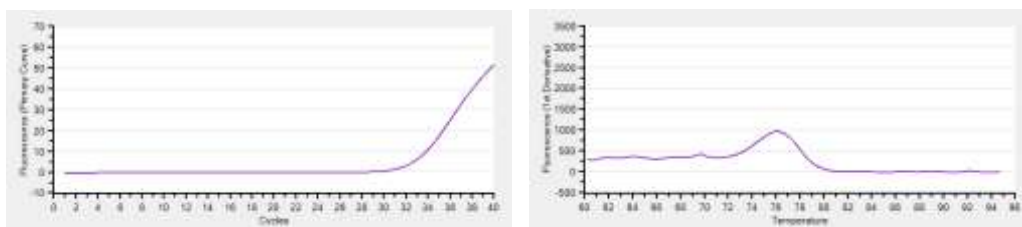
PCR 増幅産物の特異性は、融解曲線で確認します。

陽性コントロールの Tm 値と測定対象サンプルの Tm 値が一致していれば、目的の PCR 産物が得られていると推測され、陽性と判定されます。Tm 値が異なる場合は、非特異的増幅と推測され、陰性と判定されます。

（解析例）

コントロール反応の例

陽性コントロールは増幅し、陰性コントロールは増幅しないのが正しい結果です。SYBR Green I 検出の場合、反応系によっては、陰性コントロールでわずかに増幅が認められることがありますが、陽性コントロールと同じ Tm 値の産物でなければ、非特異的増幅産物と推測され問題ありません。

陰性判定の例

増幅曲線で増幅が認められても、融解曲線の Tm 値が陽性コントロールと一致しない場合は、陰性と判定されます。このような結果になる原因としては、プライマー由来の非特異的増幅が生じたこと等が考えられます。

陽性判定の例

増幅曲線で増幅が認められ、融解曲線の Tm 値が陽性コントロールと一致した場合は、陽性と判定されます。